

Aus dem Max v. Pettenkofer-Institut für Hygiene
und Medizinische Mikrobiologie der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. H. Eyer

Die Beziehungen zwischen bekannten Antigenen von enteropathogenen Colibakterien und deren Toxinbildung

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Josef Kobler
aus Oberkastl - Kr. Altötting

München 1976

1977

Aus dem Max v. Pettenkofer-Institut für Hygiene
und Medizinische Mikrobiologie der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. H. Eyer

Die Beziehungen zwischen bekannten Antigenen von enteropathogenen Colibakterien und deren Toxinbildung

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Josef Kobler

aus Oberkastl - Kr. Altötting

München 1976

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.H.Metz

Mitberichterstatter: Prof.Dr.Dr.H.Eyer

Dekan: Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.Januar 1977



INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG	1
B. MATERIAL UND METHODEN	2
1. Verwendete Bakterienstämme	2
2. Nachweis von Colitoxinen	2
2.1 am terminalen Kaninchenileum	2
2.2 Durchlässigkeit der Hautkapillaren	3
2.2.1 Abscheren der Haare am Kaninchenrücken	3
2.2.2 Narkose des Tieres und Injektion der Proben	4
2.2.3 i.v. Injektion der Evans-Blau-Lösung	4
2.2.4 Beurteilung des Permeabilitätstests an der Kaninchenhaut	4
3. Herstellung der Casamino-Hefe-Nährlösung	5
4. Herstellung von Nähragarplatten für den Immundiffusionstest	5
5. Herstellung des Kulturfiltrates (KF)	6
6. Herstellung einer Bakteriensuspension mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS)	6
7. Gewinnung von Ammoniumsulfat gefälltem Präzipitat (AMS)	7
8. Mutantengewinnung mit N-Methyl-Nitroso-N-Nitroguanidin (NNG)	7
9. Herstellung von Immunsereen	8
9.1 Parenterale Immunisierung	8
9.2 Orale Immunisierung	9
10. Serumagglutination nach Widal	9
11. Neutralisation des Kulturfiltrates	10
12. Herstellung konzentrierter Seren	10
13. Absättigen von Seren mit verschiedenen Antigenen	11
14. Herstellung von Mikro-Ouchterlony Objektträgern	12
15. Herstellung von Nähragarplatten mit eingelegtem, serumgetränktem Filterpapierstreifen (Elek-Test)	12
16. Immundiffusionstest nach Ouchterlony - modifiziert	13
17. Photographieren der Platten	14

C. ERGEBNISSE	15
1. Bildung der Colitoxine in verschiedenen Nährböden	15
1.1 Bildung von Colitoxin in Casamino-Hefe-Nährlösung (mit und ohne Spurenelementzusatz)	15
1.2 Nachweis der Colitoxine im Eluat von Casamino-Hefe-Nähr= agarplatten	15
2. Gewinnung atoxischer Mutanten von E.coli 10407	16
3. Antibakterielle und antitoxische Wirkung der verschiedenen Immunseren	17
3.1 Beschreibung des Antikörpertiters verschiedener Immunseren	18
3.2 Kontrolle der abgesättigten Seren	19
3.3 Versuche zur Neutralisation heterologer Kulturfiltrate mit Anti lebend 10407-Serum	19
4. Prüfung der Darmimmunität von parenteral und oral immunisierten Kaninchen	20
5. Ergebnisse der Diffusion von Immunseren gegen Antigene aus Bak= terienkolonien und verschiedenen Antigenzubereitungen	20
5.1 Abhängigkeit der Konzentrationen von Antigenlösung und An= tiserum für das Auftreten von Immunpräzipitationslinien	20
5.2 Präzipitationslinien bei verschiedenen Seren und Antigenen im Immundiffusionstest	21
5.3 Heterologe Neutralisation von Colitoxinen mit Anti lebend 10407-Serum	22
6. Ergebnisse der Diffusion von Immunseren gegen Kolonien lebender Bakterien	23
6.1 Beschreibung der auftretenden Linien	23
6.2 Identifizierung der entstandenen Immunpräzipitationslinien	24
6.2.1 Nachweis der O-Linie	24
6.2.2 Nachweis der H-Linie	25
6.2.3 Nachweis der K-Linie	26

D. DISKUSSION	28
E. ZUSAMMENFASSUNG	36
F. LITERATUR	37
G. ANHANG	42

A. EINLEITUNG

1897 berichtete KRAUS in Wien über Gel-Diffusion und Präzipitation zwischen Antigenen und Antiseren. 1905 beschrieb BECHTHOLD die Immundiffusion. Erste Berichte über die Verwendung der einfachen Röhrchenimmundiffusionstechnik veröffentlichte OUDIN (48) 1946 in Frankreich.

1947 beschrieb OUCHTERLONY in Schweden die "double diffusion methods" (34,35,36), und 1948 berichteten ELEK (5) und OUCHTERLONY über einen einfachen in vitro Nachweis von toxischen Diphtheriebakterien. In den darauffolgenden Jahren wurden diese Methoden mehr und mehr modifiziert und verfeinert. POULIK versuchte 1952 die Papierelektrophorese mit der Immundiffusion zu kombinieren, aber erst GRABAR und WILLIAMS stellten 1953 eine Technik vor, bei der sowohl die Elektrophorese als auch die Immundiffusion im Gelmedium beschrieben wurde (48). Sie ermöglichte eine weitere und feinere Aufteilung der zu untersuchenden Proben.

1974 gelang VASIL, HOLMES und FINKELSTEIN (47) der in vitro Nachweis von Choleratoxin nach einer modifizierten Methode von ELEK, sie verwendeten dazu Pferdeserum. Nachdem EVANS (6,7,8), TRUSCZYNSKI (46), SMITH H.W. (41) und SÖDERLIND, MÖLBY und WADSTRÖM (45) die Ähnlichkeit von Choleratoxin und Colitoxin nachgewiesen hatten, sollte ein in vitro Nachweis für toxische *Escherichia coli* nach der Methode von ELEK (5) und NALIN (33) und weiteren Modifikationen versucht werden.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Verwendete Bakterienstämme

Für den größten Teil meiner Versuche verwendete ich als pathogenen Stamm E.coli O 78, H 11, Labornummer 10407. Er wurde von EVANS (6) aus den Stühlen mit choleraähnlicher Diarrhoe erkrankter Patienten in Dacca, Bangla Desh, isoliert. E.coli 10405 diente als apathogener Kontrollstamm. Als weitere Stämme wurden verwendet:

E.coli EB 170 (Serotyp O 139, K 82 (B)), der bei abgesetzten Ferkeln Oedemkrankheit verursachte (40); E.coli 149 (Serotyp K 91 (B), K 88 (L)), den SMITH (41) aus dem Kot dysenteriekranker Ferkel anzüchtete; weiter= hin einige Stämme von EVANS (6) (E.coli O 95, E.coli 9190, E.coli 1536, E.coli 16095, E.coli 19584), sowie den Stamm E.coli 22729 (Serotyp O 119), der 1974 an der von Haunerschen Kinderklinik in München auftrat und bei Neugeborenen Enteritis verursachte.

Lyophilisiertes E.coli O 78 Lipopolysaccharidantigen wurde mir von METZ zur Verfügung gestellt.

2. Nachweis von Colitoxinen

2.1 am terminalen Kaninchenileum:

Colitoxine habe ich mit der von METZ (28) beschriebenen Methode nachgewiesen. Hierbei wurde ein an beiden Enden abgeschnürtes Ileumstück eines jungen Kaninchens in Krebs-Henseleit-Lösung zwischen einem festen und einem beweglichen Haken eingespannt, die zu untersuchenden Proben in das Darmlumen injiziert und die Bewegungen über eine kombiniert elektromechanische Apparatur aufgezeichnet.

Zubereitung einer Krebs-Henseleit-Lösung:

a) Bereitung der Stammlösungen:

NaCl	139,08 gr / l	50 ml
KCl	35,04 gr / 500 ml	5 ml
KH_2PO_4	16,06 gr / 500 ml	5 ml
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	28,84 gr / 500 ml	5 ml
NaHCO_3	25,04 gr / l	50 ml
Dextrose	21,8 gr / l	50 ml
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	30,87 gr / 500 ml	5 ml

b) Von diesen Stammlösungen wurde ein Lösungsgemisch - wie angegeben - mit Aqua dest. ad 1000 ml aufgefüllt. Im Kühlschrank konnte die fertige Lösung wenige Tage aufbewahrt werden.

2.2 Veränderung der Durchlässigkeit der Hautkapillaren

Die Kulturfiltrate enteropathogener Colistämme enthalten nach EVANS (6) ein Toxin, das nach intradermaler Verabreichung zu Induration und erhöhter Durchlässigkeit der Hautkapillaren (um die Injektionsstelle) für hochmolekulare Farbstoffe und deren Anreicherung im umliegenden Gewebe führt. Der Nachweis dieses Toxins erfolgte nach der von diesen Autoren angegebenen Methode.

2.2.1 Abscheren der Haare am Kaninchenrücken:

Das Abscheren des Tierrückens ließ sich leicht am nicht narkotisierten Tier durchführen; das Kaninchen durfte dabei aber nicht in eine Zwangslage gebracht werden. In Sitzhaltung konnten mit einer elektrischen Haarschneidemaschine die Haare am Rücken, vom Bereich des mittleren Kreuzbeins zum Nacken hin, fast ohne Abwehrbewegungen und ohne Verletzungen zu setzen, kurz geschnitten werden. Die Rückenfläche der Tiere wurde nach dem Scheren möglichst nicht mehr angefaßt, da Gewebsläsionen mit nachfolgender Entzündung die Beurteilung der Hautreaktion schwieriger gestalten.

2.2.2 Narkose der Tiere und Injektion der Proben:

Die Injektion der zu untersuchenden Proben erfolgte in Narkose. Ein kurz oder mittellang wirkendes Barbiturat (Thio- oder Pentobarbital-Natrium) wurde den Tieren in die Ohrvene injiziert. Bei genügender Narkosetiefe (keine Reaktion auf Schmerzreize in der Haut) unterteilten wir den Kaninchenrücken mit Hilfe eines Filzstiftes in sechs Felder, um am folgenden Tag die Injektionsstellen leichter finden zu können.

30-40 der zu untersuchenden Proben von 0,1 ml konnten mühelos auf einem Kaninchenrücken intracutan injiziert werden. Bei jedem Test führten wir zum Vergleich eine sicher positive Probe (Kulturfiltrat von E.coli 10407) und eine sicher negative Probe (Kulturfiltrat von E.coli 10405) mit.

2.2.3 i.v. Injektion der Evans-Blau-Lösung:

Am darauffolgenden Tag wurde dem Kaninchen 20-25 mg Evans-Blau (10 mg/ml) pro kg Körpergewicht wiederum in die Ohrvene injiziert. Weitere 3 Stunden später ließ sich die Hautreaktion ablesen. Evans-Blau bleibt im allgemeinen im Blutgefäßsystem, tritt aber an entzündeten Stellen durch die Kapillaren aus und läßt sich gut sichtbar nachweisen.

2.2.4 Beurteilung des Permeabilitätstestes an der Kaninchenhaut:

Positive Proben ergaben in der Haut eine deutlich erhabene Verhärtung mit intensiver Blaufärbung des entzündeten Gebietes.

Die Beurteilung der Wirksamkeit einer Probe wurde stets mit dem Reaktionsausfall der Kontrollinjektionen verglichen, da von Tier zu Tier Unterschiede im Ausmaß der Hautreaktionen bestanden.

Negative Proben führten weder zu einer Hautverdickung noch zu einer Blaufärbung, im allgemeinen waren diese Injektionsstellen nach 24 Stunden nicht mehr auffindbar.

Die Ergebnisse wurden nicht quantitativ, wie etwa durch Ausmessen der Blaufärbungszone (37), ausgewertet.

3. Herstellung der Casamino-Hefe-Nährlösung:

Für die Gewinnung des Colitoxins verwendete ich das von EVANS (6,7) beschriebene Casamino-Hefe-Nährmedium. In einen 2 l Kolben wurden

20 gr Casamino acids (Difco),
6 gr Hefeextrakt (Difco),
2,5 gr Natriumchlorid und
8,71 gr Dikaliumhydrogenphosphat eingewogen und mit Aqua dest. zu 1 l Lösung aufgefüllt, anschließend gut geschüttelt und mit 1 ml einer Spurenelementlösung (*) versetzt. Dieser Ansatz wurde nun mit 0,1 n NaOH auf einen pH Wert von 8,5 eingestellt und mit Hilfe eines Seitz-Filters sterilfiltriert.

4. Herstellung der Nähragarplatten für den Immundiffusionstest:

Nähragarplatten wurden hergestellt aus doppelt konzentriertem Casamino-Hefe-Nährmedium und Jonagar Nr.2 im Verhältnis 1:1. Hierbei verzichtete ich auf den Zusatz von Spurenelementen, da die darin enthaltenen Schwermetalle eventuell die Bildung von Immunpräzipitaten hätten behindern können(34,35).

Vorversuche ergaben, daß Jonagar Nr.2, 1,5% mit Casamino-Hefe-Nährmedium vermischt, die günstigsten Bedingungen für meinen Versuch boten.

Zur Herstellung dieser Platten wurde Jonagar Nr.2, 1,5% in PBS (**) ange-

* Spurenelementlösung:

5% MgSO_4 , 0,5% MnCl , 0,5% FeCl_3 gelöst in 1 molarer H_2SO_4

** Herstellung von phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS):

139,08 gr NaCl , 137,0 gr K_2HPO_4 und 15,6 gr KH_2PO_4 werden zu 2 l Stammlösung mit Aqua dest. aufgefüllt. Dies ergibt ein Konzentrat, das wiederum 1:20 mit destilliertem Wasser verdünnt, die Gebrauchslösung darstellt.

setzt, mindestens 40 Minuten überdampft und anschließend in ein Wasserbad von 50-60°C gebracht. Ebenso wurde doppelt konzentriertes Casamino-Hefe-Nährmedium in dieses Wasserbad gestellt, um beim anschließenden Vermischen mit dem Jonagar eine vorzeitige Abkühlung und Verfestigung des Agars zu verhindern. Eine Denaturierung der Eiweißstoffe im Casamino-Hefe-Nährmedium ist bei dieser Behandlung nicht zu befürchten. Je 4 ml dieses Nähragars wurden in kleine Petrischalen (Durchmesser 5,2 cm) gegossen. Die Platten blieben nun 3-4 Stunden stehen. In einer feuchten Kammer ließen sie sich wenige Tage im Kühlschrank aufbewahren.

5. Herstellung von Kulturfiltrat (KF)

50-100 ml Casamino- Hefe-Nährmedium wurden in einen 500 ml Glaskolben eingefüllt, mit dem zu untersuchenden Bakterienstamm beimpft und auf einem Schütteltisch 18-24 Stunden bei 37°C bebrütet. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Bakterienkultur 20 Minuten bei 6000 g und die Sterilfiltration des Überstandes.

6. Herstellung einer Bakteriensuspension mit phosphat-gepuffelter Kochsalzlösung (PBS)

Eine 18-24 Stunden-Kultur von E.coli 10407 wurde bei niedrigen Touren abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das Sediment in PBS aufgenommen und erneut abgeschleudert. Die abgesetzten Bakterien bezeichnete ich als "gewaschene Bakterien", die, je nach Bedarf, mit PBS zur gewünschten Bakteriendichte resuspendiert wurden.

7. Gewinnung von Ammoniumsulfat gefälltem Präzipitat (AMS):

Kulturfiltrat von E.coli 10407 (24 Stunden Kultur) wurde mit kristallinem Ammoniumsulfat zu 90% gesättigt (63 gr Ammoniumsulfat auf 100 ml Kulturfiltrat), nach 3 Stunden das entstandene Präzipitat bei 13000 g abzentrifugiert und anschließend in PBS wieder aufgelöst. Das aus 100 ml Kulturfiltrat abgeschiedene Präzipitat wurde in 2 ml PBS gelöst, anschließend dialysiert und steriltfiltriert.

8. Mutantengewinnung mit N-Methyl-Nitroso-N-Nitroguanidin (NNG):

Zu einer E.coli 10407-Kultur (Peptonbrühe) setzte ich nach 4 Stunden NNG in einer Endkonzentration von 40 mcg/ml zu. Sofort nach der Zugabe wurde die Kultur vorsichtig bei 37°C 10 Minuten geschüttelt, anschließend eine 1000-fache Verdünnung in Peptonbrühe hergestellt und die Verdünnung 90 Minuten bei 37°C bebrütet. Aus dieser Kultur gewann ich mit PBS um die Faktoren 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} verdünnte Bakteriensuspensionen, spatelte davon jeweils 0,1 ml auf Peptonagarplatten aus und bebrütete 24 Stunden bei 37°C.

Von Einzelkolonien, die auf diesen bebrüteten Agarplatten gewachsen sind, wurden 30-40 ml Casamino-Hefe-Nährmedium und eine Agarplatte beimpft. Die Kulturfiltrate wurden nur im Test auf der Kaninchenhaut auf ihren Toxingehalt geprüft. Eventuell vorhandene toxinnegative Mutanten wurden nochmals mit NNG behandelt, um die erhaltene Eigenschaft zu stabilisieren. Es stellte sich heraus, daß einmal behandelte, toxinnegative Colibakterien in später angelegten Flüssigkulturen plötzlich wieder Colitoxin produzierten. Blieb eine Kolonie nach 3-4 Subkulturen im Test auf der Kaninchenhaut toxinnegativ, wurde sie im Test am isolierten Kaninchendarm geprüft. Zugleich verglich ich NNG-behandelte Kolonien mit unbehandelten E.coli 10407 im Plattenimmundiffusionstest und versuchte, Unregelmäßigkeiten bei den auftretenden Präzipitationslinien NNG-behandelter Kolonien mit den Ergebnissen im Test auf der Kaninchenhaut auszuwerten.

9. Herstellung von Immunsereen:

9.1 Parenterale Immunisierung

Von den verschiedenen Antigenen verabreichte ich jeweils 6 Injektionen im Abstand von 3-4 Tagen 3-5 kg schweren Kaninchen; die letzte Injektion erfolgte erst nach 7 Tagen. Eine Woche später entblutete ich die Tiere. Die Impfdosis der ersten beiden Injektionen betrug 1 ml, die der folgenden 5 je 2 ml der Impfflüssigkeit.

a) Immunisierung mit lebenden Bakterien:

Aus gewaschenen Bakterien bereitete ich eine standardisierte Bakterien=suspension (optische Dichte 0,3 gemessen an einem Photometer bei 546 nm) und injizierte diese Impfsuspension den Versuchstieren nach obigem Zeit=plan in die Ohrvene.

b) Immunisierung mit bakterienfreiem Kulturfiltrat:

Nach Abscheren der Haare und Desinfektion der Haut mit 70%igem Isopropylalkohol im Bereich des M.semitendineus und des M.semimembranaceus wurde den Versuchstieren sterilfiltriertes Kulturfiltrat intramuskulär verabreicht. Der ersten Impfdosis (1 ml) wurde die selbe Menge Freund=sches Adjuvans hinzugesetzt.

c) Immunisierung mit AMS:

Ammoniumsulfat gefälltes Präzipitat (2 ml AMS aus 100 ml Kulturfiltrat) wurde den Kaninchen i.m. injiziert; der ersten Impfdosis AMS wurde ebenfalls 1 ml Freund=sches Adjuvans zugefügt.

d) Immunisierung mit formalinabgetöteten Bakterien:

Gewaschene E.coli 10407 wurden in PBS resuspendiert und auf eine optische Dichte von 0,5 eingestellt. Dazu pipettierte ich konzentrierte Formalinlösung (40%) bis zu einer Endkonzentration von 0,4% und injizierte diese Suspension nach 3 Stunden Einwirkungszeit den Kaninchen i.v..

e) Immunisierung mit abgekochten Bakterien:

Gewaschene E.coli 10407, in PBS resuspendiert, wurden 2 Stunden im Wasserbad gekocht, mit PBS auf die optische Dichte 0,8 eingestellt und den Kaninchen i.v. verabreicht.

9.2 Orale Immunisierung:

a) mit lebenden Bakterien:

"Orale" Impfungen führte ich alle 3-4 Tage durch, die Gesamtzahl der "Schluckimpfungen" wurde sogar auf 15 erhöht. Die ersten 3 Impfungen bestanden aus einer dicken, formalinabgetöteten Bakteriensuspension, um einer eventuellen Massenausscheidung oder Erkrankung vorzubeugen.

Zur eigentlichen Immunisierung mit "Lebendimpfstoff" verwendete ich die gleiche Bakteriensuspension von E.coli 10407 wie zur intravenösen Immunisierung. Dabei wurde die Bakteriensuspension in eine 2 ml Kunststoffspritze aufgezogen, der Konus der Spritze seitlich in das Maul des Kaninchens eingeführt und die Impfflüssigkeit über dem Zungengrund abgesetzt.

b) mit gekochten Bakterien:

Eine dicke Bakteriensuspension von E.coli 10407 wurde 2 Stunden im Wasserbad gekocht und je 2 ml dieser Aufschwemmung den Versuchstieren pro Schluckimpfung nach oben beschriebenem Zeitplan zugeführt. 8 Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Kaninchen entblutet.

Um das Verhalten des Ileums dieser Tiere direkt zu prüfen, eröffnete ich sofort nach dem Entbluten deren Bauchhöhle und führte mit dem präparierten Ileum den vorher beschriebenen Toxintest durch.

10. Serumagglutination nach Widal

Die Serumagglutination nach Widal verwendete ich zur

a) Bestimmung des agglutinierenden Antikörpertiters der von mir hergestellten Immunsere.

Dabei zeigte sich, daß obiger Titer im allgemeinen mit dem Gehalt an anderen Antikörpern (antitoxische Antikörper, Antikörper gegen H und K Antigen) korreliert.

b) Überprüfung der Absättigungsversuche.

11. Neutralisation des Kulturfiltrats - Nachweis im Permeabilitäts= test an der Kaninchenhaut

Aus antitoxischen Immunseren (Anti lebend 10407-Serum, Anti AMS 10407-Serum, Anti KF 10407-Serum) bereitete ich Verdünnungsreihen von 1:10 bis 1:640. Dazu pipettierte ich sterilfiltriertes Kulturfiltrat im Verhältnis 1:1 zur Serumverdünnung, durchmischte den Ansatz gut und bewahrte ihn eine Stunde bei Zimmertemperatur auf. Das ausgeflockte Immunpräzipitat wurde anschließend abzentrifugiert und der Überstand jeweils im Permeabilitätstest an der Kaninchenhaut auf seinen Toxingehalt hin geprüft.

12. Herstellung konzentrierter Seren

Frischblut immunisierter Kaninchen blieb zunächst 6 Stunden bei Zimmertemperatur und 15 Stunden im Kühlschrank (4°C) stehen. Während dieser Zeit trennte sich das Serum von Blutzellen und Fibrin, es konnte dann als klare Flüssigkeit abgehoben werden. Die letzten korpuskulären Bestandteile entfernte ich durch Abzentrifugieren bei niedrigen Touren. Anschließend setzte ich dem Serum, unter ständigem Rühren auf dem Magnetrührer, gesättigte Ammoniumsulfatlösung (1 Volumenteil Ammoniumsulfat auf 2 Volumenteile Serum) zu. Dabei bildete sich ein milchig trübes Präzipitat, das sich in der Zentrifuge bei niedrigen Touren rasch absetzte.

Der klare Überstand wurde verworfen, das weiße, käsige Sediment in einem Zehntel des ursprünglichen Serumvolumens mit PBS aufgelöst. Die störende hohe Ammoniumsulfatkonzentration verringerte sich beim Dialysieren gegen PBS (s. AMS-Gewinnung S.7).

Das so behandelte Eiweißkonzentrat wurde sterilfiltriert und weiterhin als "konzentriertes Serum" bezeichnet, dieses entsprach nach dem Dialysieren etwa 1/5 bis 1/10 des ursprünglichen Serumvolumens.

13. Absättigen von Seren mit verschiedenen Antigenen

Bestimmte Antikörper in Vollseren oder Serumkonzentraten konnten mit Hilfe von Antigenen als Antigen-Antikörperkomplexe eliminiert und als unlösliche Immunpräzipitate aus den Seren abzentrifugiert werden.

In zahlreichen Vorversuchen wollte ich optimale Bedingungen zum Absättigen der Immunsere herausfinden. Dazu versetzte ich konzentriertes Anti lebend 10407-Serum, Anti AMS 10407-Serum und Serum F (Serum, gewonnen aus Kaninchen, die mit formalinabgetöteten E.coli 10407 immunisiert waren) mit:

- a) E.coli 10407 Bakteriensuspensionen verschiedener optischer Dichten (0,3; 0,5; 0,7; 0,9 bis zu dicken Bakteriensuspensionen) im Verhältnis 1:1.
- b) Ammoniumsulfat gefälltes Präzipitat (2 ml AMS auf 100 ml KF) im Verhältnis 1:1.
- c) gewaschenem E.coli 10407 Bakteriensediment, gewonnen in Casamino-Hefe-Nährmedium (Mengenverhältnis Antigen:Antiserum 1:5).
- d) 20 Minuten auf 60°C erhitztem Bakteriensediment von E.coli 10407, gewonnen in Casamino-Hefe-Nährmedium (Mengenverhältnis Antigen:Antiserum 1:5).
- e) 2 Stunden gekochtem Bakteriensediment von E.coli 10407, gewonnen in Casamino-Hefe-Nährmedium (Mengenverhältnis Antigen:Antiserum 1:5).
- f) unbehandeltem Bakteriensediment von E.coli 10407 I, gewonnen in Casamino-Hefe-Nährmedium (Mengenverhältnis Bakteriensediment:Antiserum 1:5).

Die Einwirkungsdauer der Antigene auf die Antiserumgemische variierte ich:

- a) 24 Stunden bei 37°C und 24 Stunden bei + 4°C
- b) 3 Stunden bei 37°C und 24 Stunden bei + 4°C
- c) 3 Stunden bei 37°C und 24 Stunden bei Zimmertemperatur

Als günstigste Bedingung für die Absättigung stellte sich heraus, wenn das Antiserum mit einer großen Menge Bakterien (Bakteriensediment) 3 Stunden bei 37°C und 24 Stunden bei Zimmertemperatur aufbewahrt und zwischendurch öfters aufgeschüttelt wurde, außerdem das unlösliche Immunpräzipitat und das überschüssige unlösliche Antigen abzentrifugiert und der klare Überstand, das abgesättigte Serum, im Anschluß an den Absättigungsvorgang sterilfiltriert wurde.

14. Herstellung von Mikro-Ouchterlony Objektträgern

Objektträger wurden mit einer Mischung von Aceton und Brennspritus im Verhältnis 1:2 gereinigt, getrocknet, mit einer Schicht Ouchterlony-Agar (Jonagar Nr.2 und 0,1% Natriumacid) bepinselt und so in einem Heißluftsterilisator 40 Minuten lang bei 180°C gehalten. Der dünne Agarfilm haftete danach fest auf der Objektträgeroberfläche, die nun mit 2 ml Ouchterlony-Agar beschichtet wurde.

Die fertigen Objektträger durften nur wenige Minuten an der Luft abkühlen, um dann sofort in eine feuchte Kammer eingelegt zu werden, da sie äußerst empfindlich gegen Austrocknung sind. Mit einer Rosette aus 7 Stanzröhrchen (Durchmesser 30 mm) wurden Zylinder aus dem Agar gestanzt und mit Hilfe einer stumpfen Kanüle, die über einen Schlauch an einer Unterdruckquelle angeschlossen war, abgesaugt. Anschließend füllte ich die zu prüfenden Proben mit Kapillarpipetten in die ausgestanzten Löcher ein.

15. Herstellung von Nähragarplatten mit eingelegtem serumgetränktem Filterpapierstreifen nach ELEK

In Petrischalen (Durchmesser 5,2 cm) legte ich sofort nach dem Eingießen des Casamino-Hefe-Nähragars einen etwa 2,5 cm langen und 0,5 cm breiten, mit Immuns serum getränkten Filterpapierstreifen ein und tauchte ihn mit einer sterilen Pinzette unter. Nach dem Erkalten strich ich eine 10^{-3} fach verdünnte Bakteriensuspension (E.coli 10407 und E.coli 10405) im rechten Winkel zum Filterpapierstreifen aus und bebrütete die Platten 18 Stunden bei 37°C. In den Agar diffundierten sowohl Antiserum als auch die von den Bakterien gebildeten löslichen antigenwirksamen Produkte und bildeten bei ihrem Zusammentreffen Immunpräzipitate.

Mit Hilfe dieses Tests konnte ich einerseits eine für den toxischen Stamm spezifische Immunpräzipitationslinie nicht herausfinden, andererseits waren die erschienenen Linien nicht zu deuten.

16. Immundiffusionstest nach Ouchterlony - modifiziert

Für diesen speziellen Plattentest verwendete ich die auf S.5 beschriebenen Casamino-Hefe-Nähragarplatten. Auf deren Unterseite ritzte ich mit einem Stechzirkel einen Kreis von 1,6-2 cm Durchmesser ein, kreuzte auf der Kreislinie einen Punkt an und trug, von diesem Punkt ausgehend, mit dem Stechzirkel fortlaufend 5 mal den Radius auf der Kreislinie ab. Die dabei entstehende Figur entspricht der Rosette im Mikro-Ouchterlony Test.

Je nach Bedarf hob ich mit einem Stanzröhrchen (Durchmesser 4 mm, sonst s. Mikro-Ouchterlony Technik S. 12) Agarzylinder über den vorgezeichneten Punkten aus, beschickte die entstandenen Löcher mit den zu prüfenden Testflüssigkeiten oder stichelte mit einer feinen Kanüle ebenfalls über den vorgezeichneten Punkten verschiedene Bakterienstämme auf die Agaroberfläche.

Mit lebenden Bakterien beimpfte Platten wurden vor dem Einfüllen der ausgestanzten Löcher mit Testflüssigkeit 18-24 Stunden, in einer feuchten Kammer liegend, bei 37°C bebrütet. Eine Antrocknung der Agaroberfläche im Brutschrank vor dem Besticheln (2-3 Minuten bei offenem Deckel) ist empfehlenswert.

Die so behandelten Platten blieben 24 Stunden bei Zimmertemperatur und weitere 24 Stunden im Kühlschrank stehen (in der feuchten Kammer). Danach waren die Bedingungen zum Photographieren optimal, die Immunpräzipitationslinien nach dieser Zeit deutlich ausgeprägt, der Agar war noch frisch und unverändert.

Da bei dieser Versuchsanordnung die Anwendung eines Konservierungsmittels nicht möglich war, die Behandlungs- und Beobachtungszeit sich aber über mehrere Tage erstreckte, mußten die Versuche unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden.

Auf diese Weise war es möglich, mit einer Platte sowohl die Ouchterlony Technik als auch die Züchtung von verschiedenen Bakterienstämmen nebeneinander durchzuführen und miteinander zu vergleichen. Parallel zu diesem Plattentest setzte ich, wenn möglich, immer die Mikro-Ouchterlony Technik ein, um etwaige abweichende Ergebnisse frühzeitig zu erfassen.

17. Photographieren der Platten

Immunpräzipitationslinien im Plattentest ließen sich bei direkter seitlicher Beleuchtung vor dunklem Hintergrund photographisch darstellen. In einem von mir gebauten Holzkasten (Abb.1), der mit einer 60 Watt Glühbirne ausgestattet war, erhielt ich, über einem ausgesägten Quadrat, an der oberen Seite des Kastens eine direkte seitliche Beleuchtung der Agarplatten. Dies geschah durch einen horizontal und zwei schräg zur Lampe angebrachte Spiegel. Bei richtiger Einstellung dieser Spiegel war es möglich, ungefärbte Immunpräzipitationslinien in einer Agarplatte zu photographieren.

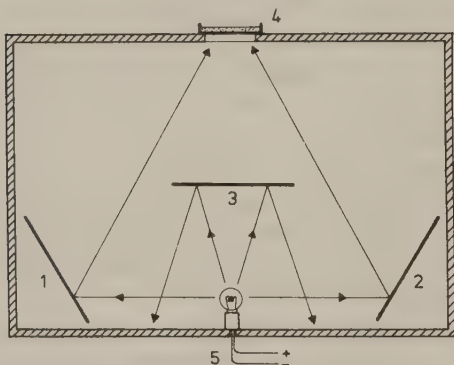


Abb.1: 1,2,3 = Spiegel; 4 = Petrischale; 5 = Lichtquelle

Für die Aufnahmen verwendete ich eine LEICA-Spiegelreflexkamera mit Fernauslöser und einen Film AGFA PAN 100. Den Kasten stellte ich auf eine Reproduktionsvorrichtung (LEITZ) und photographierte darauf die Platten.

C. E R G E B N I S S E

1. Bildung der Colitoxine in verschiedenen Nährböden

1.1 Bildung von Colitoxin in Casamino-Hefe-Nährlösung (mit und ohne Spurenelementzusatz)

Für meine Versuche mit der Immundiffusion mußte ich die Frage klären, ob der Zusatz einer Spurenelementlösung in die Casamino-Hefe-Nährlösung für die Colitoxinproduktion unbedingt erforderlich ist, da die darin enthaltenen Schwermetallionen eventuell für die Störungen bei der Immunkomplexbildung verantwortlich sein könnten (34,35).

Dazu beimpfte ich parallel Casamino-Hefe-Nährlösung mit und ohne Spurenelementzusatz mit E.coli 10407 Bakterien, bebrütete diese 18-24 Stunden auf dem Schütteltisch bei 37°C und prüfte die daraus gewonnenen Kulturfiltrate im Permeabilitätstest an der Kaninchenhaut und im Test am isolierten Kaninchendarm. Es stellte sich heraus, daß die Kulturfiltrate mit und ohne Spurenelementzusatz in gleichem Maße sowohl Darmrhythmusstörungen verursachten, als auch die Permeabilität der Hautkapillaren erhöhten.

1.2 Nachweis der Colitoxine im Eluat von Casamino-Hefe-Nähragarplatten

Weiterhin war herauszufinden, ob toxische Colibakterien ihre Toxine auch auf festen Casamino-Hefe-Nähragarplatten produzieren. Auf eine dieser Nähragarplatten strich ich E.coli 10407 Bakterien aus, bebrütete sie 18 Stunden in der feuchten Kammer, eluierte anschließend Nähragar samt Bakterien in wenigen Milliliter PBS (2 Stunden) und zentrifugierte den Ansatz ab. Der Überstand ergab bei der Permeabilitätsprobe an der Kaninchenhaut und beim Test am isolierten Kaninchendarm deutlich positive Ergebnisse. Als Kontrolle führte ich in beiden Versuchen den atoxischen Stamm E.coli 10405 mit.

2. Gewinnung atoxischer Mutanten von E.coli 10407

Dieser aufwendige Suchtest nach Mutanten von E.coli 10407 wurde in der Hoffnung durchgeführt, eine atoxische Variante zu erhalten, deren Antigenstruktur mit der von E.coli 10407 übereinstimmt. Damit wäre es möglich, Immunseren mit dieser Mutante abzusättigen und so ein Serum zu gewinnen, das nur noch antitoxische Antikörper enthält.

Nach der Behandlung mit N-Methyl-Nitroso-N-Nitroguanidin (NNG) wurden an mehreren Tagen von etwa 400 Einzelkolonien je 20 ml Kulturfiltrat gewonnen und im Test an der Kaninchenhaut auf ihren Colitoxingehalt geprüft. Parallel dazu beimpfte ich Nähragarplatten mit je 5 der zu untersuchenden Kolonien und einer unbehandelten Kolonie E.coli 10407. Die Einsaat erfolgte mit einer Impfnadel derart, daß die sich bildenden Kolonien rosettenartig um ein mit Anti lebend 10407-Serum gefülltes Stanzloch angeordnet waren. Mit Hilfe dieser beiden Methoden gelang es mir, zwei E.coli 10407 Varianten zu isolieren, deren Kulturfiltrate im Permeabilitätstest an der Kaninchenhaut negativ reagierten und sich im Immundiffusionstest vom Ausgangsstamm durch das Fehlen einer Immunpräzipitationslinie unterschieden.

Bei der Überprüfung der biochemischen Eigenschaften erwiesen sich beide Varianten als unbeweglich (Abb.2). Ich bezeichnete diese Varianten im weiteren als E.coli 10407 I und II. Ihr Koloniewachstum war insgesamt weniger üppig als das vom Wildtyp. Trotz negativem Permeabilitätstest an der Kaninchenhaut waren ihre Kulturfiltrate noch in der Lage, die regelmäßigen Bewegungen eines terminalen Ileumstückes zu irritieren (Kurven 1 und 2, s.Anhang).

Außerdem fiel ein weiterer Stamm auf (E.coli 10407 - raue Oberfläche), dessen Kolonien ebenfalls geringeres Wachstum als der Wildtyp aufwiesen. Dieser Stamm ergab sowohl im Permeabilitätstest an der Kaninchenhaut als auch am isolierten Ileumstück positive Ergebnisse. Bei der Überprüfung seiner biochemischen Eigenschaften stellte sich heraus, daß er wie unbehandelte E.coli 10407 Bakterien beweglich war. Der Immunpräzipitationstest zeigte für diesen Stamm ebenfalls eine fehlende, bzw. sehr schwach ausgeprägte mittlere Linie.

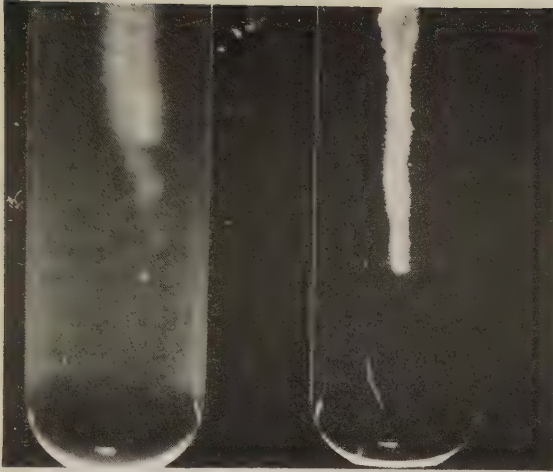


Abb.2: Nachweis der Unbeweglichkeit von E.coli 10407 I (rechts) im Vergleich zu E.coli 10407 (links) im Beweglichkeitsagar

3. Antibakterielle und antitoxische Wirkung der verschiedenen Immunseren

In den von mir gewonnenen Immunseren konnte mit Hilfe der Serumagglutination nach Widal und der Permeabilitätsprobe an der Kaninchenhaut der Antikörpergehalt ermittelt werden.

Anti lebend 10407-Serum und Anti AMS 10407-Serum enthielten antitoxische Antikörper, dagegen nicht Serum F und Seren, die nach Immunisierung mit gekochten und 20 Minuten auf 60°C erhitzten E.coli 10407 erhalten wurden.

Die antitoxischen Antikörper fehlten auch in Seren von oral immunisierten Kaninchen, unabhängig davon, ob den Tieren lebende oder tote Bakterien verabreicht wurden.

Der Antikörpertiter (Probe nach Widal) von nativen Seren oral immunisierter Kaninchen lag unter 1:10. Die orale Verabreichung von E.coli 10407 führte weder zu Krankheitserscheinungen noch zu Antikörperanstieg.

3.3 Beschreibung des Antikörpertiters verschiedener Immunseren

Beim Permeabilitätstest an der Kaninchenhaut zeigten die tierpathogenen Stämme E.coli EB 170, E.coli O 149, sowie alle Stämme, die uns von EVANS (6,7) zur Verfügung gestellt wurden, positive Hautreaktionen (Ausnahme: die apathogenen Stämme E.coli 10405 und E.coli 1536). Da auch das Kulturfiltrat des säuglingspathogenen Stammes E.coli O 119 (Nr. 22729/74) eine stark positive Permeabilitätsprobe an der Kaninchenhaut und Störungen der Darmrhythmik am terminalen Ileum hervorrief, immunisierte ich mit diesen Stämmen, analog zu den vorhergehenden Versuchen, ebenfalls Kaninchen (Antigen: lebende Bakterien und AMS) und prüfte den Titerverlauf im Serum und im Permeabilitätstest an der Kaninchenhaut. Die agglutinierenden Antikörper- und Neutralisationstiter lassen sich in der folgenden Tabelle 1 ablesen.

Tabelle 1: Neutralisations- und serumagglutinierende Titer bei verschiedenen Antiseren mit homologen Kulturfiltraten

Antiseren	Zahl der immun.Kan.	Serumagglut. nach Widal	Neutr.titer ("Hauttest")
Anti leb.10407	10	1:1600*	1:160*
Anti AMS 10407	12	(1:800-1:1600)** 1:400 (1:200-1:800)	(1:80-1:160)** 1:160-1:320
Anti KF 10407	2	1:400, 1:400	1:40, 1:40
Serum F 10407	2	1:1600, 1:1600	negativ
Anti 10407 gek.	2	1:400, 1:200	negativ
Anti leb.O 149	2	1:200, 1:100	1:160, 1:160
Anti AMS O 149	2	1:100, 1:100	1:320, 1:320
Anti leb.O 170	2	1:1600, 1:1600	1:40, 1:80
Anti AMS O 170	2	1:400, 1:400	1:80, 1:80
Anti AMS 22729	2	1:3200, 1:3200	1:80, 1:160
Anti AMS O 139	2	1:1600, 1:1600	1:160, 1:160
Serum A	2	negativ	negativ
Serum B	2	negativ	negativ

* = häufigster Wert

** = niedrigster und höchster Wert

Serum A = Serum von Kaninchen, die oral mit lebenden E.coli 10407 immunisiert wurden

Serum B = Serum von Kaninchen, die oral mit gekochten E.coli 10407 immunisiert wurden

3 Kaninchen verendeten während der Impfaktion

Kaninchenseren, die nach mehreren Injektionen keinen Antikörperanstieg erkennen ließen, wurden von der weiteren Verarbeitung ausgeschlossen.

3.2 Kontrolle der abgesättigten Seren

Der Erfolg der Absättigung wurde mit Hilfe des Serumagglutinations=tests nach Widal und der Permeabilitätsprobe an der Kaninchenhaut kontrolliert.

Eine negative Serumagglutination war feststellbar, wenn Anti lebend 10407-Serum und Anti AMS 10407-Serum abgesättigt wurden mit:

- a) gekochten E.coli 10407 Bakterien,
- b) 20 Minuten auf 60°C erhitzten E.coli 10407 Bakterien,
- c) gewaschenen E.coli 10407 Bakterien oder
- d) AMS 10407 (Ammoniumsulfat gefälltes Präzipitat von E.coli 10407).

Der antitoxische Antikörpertiter in den oben aufgeführten Seren

- blieb unverändert erhalten nach Absättigung mit den unter a) und b) aufgeführten Antigenen,
- fiel gering bei der Absättigung mit gewaschenen Bakterien,
- verschwand bei der Absättigung mit AMS vollständig.

3.3 Versuche zur Neutralisation heterologer Kulturfiltrate mit Anti lebend 10407-Serum

Neben der Neutralisation von Kulturfiltrat mit homologen Immunseren wurden auch Colitoxine (Kulturfiltrat) der Serotypen O 139, EB 170 und O 119 mit Anti lebend 10407-Serum (Endkonzentration 1:20) versetzt und der Erfolg im Permeabilitätstest an der Kaninchenhaut kontrolliert. Dabei zeigte sich, daß Anti lebend 10407-Serum sowohl das Kulturfiltrat wie auch AMS von E.coli 149 neutralisiert; Kulturfiltrat und AMS von E.coli Serotyp O 139 dagegen nicht. Die Reaktion des Kulturfiltrats und AMS von E.coli Serotyp O 119 (Nr. 22729) mit Anti lebend 10407-Serum ließ sich nicht eindeutig als positiv oder negativ einstufen.

4. Prüfung der Darmimmunität von parenteral und oral immunisierten Kaninchen

Für diese Versuchsreihe am terminalen Ileum wurden:

- a) 4 Kaninchen mit lebenden E.coli 10407 immunisiert.
- b) 6 Kaninchen mit Ammoniumsulfat gefälltem Präzipitat von E.coli 10407 i.m. immunisiert.
- c) 2 Kaninchen mit lebenden E.coli 10407 oral immunisiert.
- d) 2 Kaninchen mit gekochten E.coli 10407 immunisiert.

Keines der Darmstücke zeigte eindeutig Resistenz gegenüber der darm=rhythmusstörenden Wirkung des Kulturfiltrates von E.coli 10407 (Kur=ven 3-6, s. Anhang).

5. Ergebnisse der Diffusion von Immunseren gegen Antigene aus Bakterienkolonien und verschiedenen Antigenzubereitungen

5.1 Abhängigkeit der Konzentrationen von Antigenlösung und Antiserum für das Auftreten von Immunpräzipitationslinien

In die Stanzlöcher von Mikro-Ouchterlony Objektträgern wurde konzentriertes Anti lebend 10407-Serum und das in 1 ml PBS aufgelöste Ammoniumsulfat gefällte Präzipitat aus 100 ml Kulturfiltrat in folgenden Verdünnungsstufen gegeben:

Immunserum	Antigen
1:1	1:1
1:1,5	1:2
1:2	1:4
1:3	1:6
1:5	1:8
1:10	1:16

Bei diesem Versuch ließ ich alle vorgegebenen Serumverdünnungen gegen alle Antigenverdünnungen und umgekehrt alle Antigenverdünnungen gegen alle Serumverdünnungen diffundieren. Die Immunpräzipitationslinien zeichneten sich umso deutlicher ab, je mehr sowohl das Antigen als auch das Immunserum konzentriert waren.

5.2 Präzipitationslinien bei verschiedenen Seren und Antigenen im Immundiffusionstest

Bezeichnung der aufgetretenen Linien:

O-Linie: Immunpräzipitationslinie zwischen Körperantigen und Anti-
körper gegen Körperantigen

K-Linie: Immunpräzipitationslinie zwischen Kapselantigen und Anti-
körper gegen Kapselantigen

H-Linie: Immunpräzipitationslinie zwischen Geißelantigen und Anti-
körper gegen Geißelantigen

AMS-Lösung (3 ml gewonnen aus 100 ml Kulturfiltrat) ergab gegen

- Anti lebend 10407-Serum eine sehr starke Immunpräzipitationslinie (Abb.3, O-Linie).
- Serum F dieselbe Immunpräzipitationslinie, jedoch weniger stark ausgeprägt (keine Abbildung).
- Anti AMS-Serum 2 schwache, wolkige Immunpräzipitationszonen (Abb. 3 und 5, K-Linie, H-Linie).
- abgesättigte Seren keine sichtbaren Immunpräzipitate (keine Abbildung)

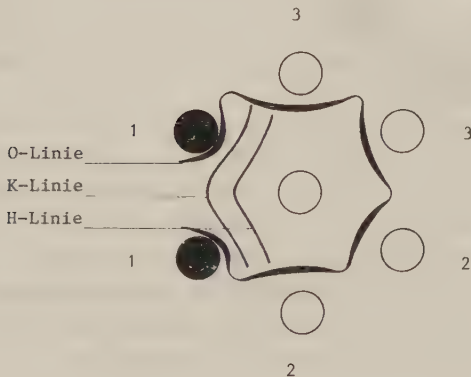


Abb.3: Immunpräzipitation zwischen Anti lebend 10407-Serum einerseits (zentral) und AMS 10407(2), AMS 10407 2 Std. gekocht (3) und lebenden E.coli 10407 andererseits

Alle Seren mit hohem agglutinierendem Antikörpertiter (Anti lebend 10407-Serum, Serum F) ergaben in Abb.3 mit einer 2 Stunden gekochten, dicken E.coli 10407-Bakteriensuspension eine deutliche Linie, die mit der Immunpräzipitationslinie zwischen Anti lebend Serum und AMS-Lösung identisch ist.

Alle Seren mit hohem agglutinierendem Antikörpertiter und Anti AMS 10407-Serum ergaben mit einer 20 Minuten auf 60°C erhitzten dicken Bakterien-suspension von E.coli 10407 neben der oben beschriebenen O-Linie eine zweite, schwächer ausgeprägte Immunpräzipitationslinie, die näher zum Immunserum hin gelegen ist (s.Abb.4, K-Linie).

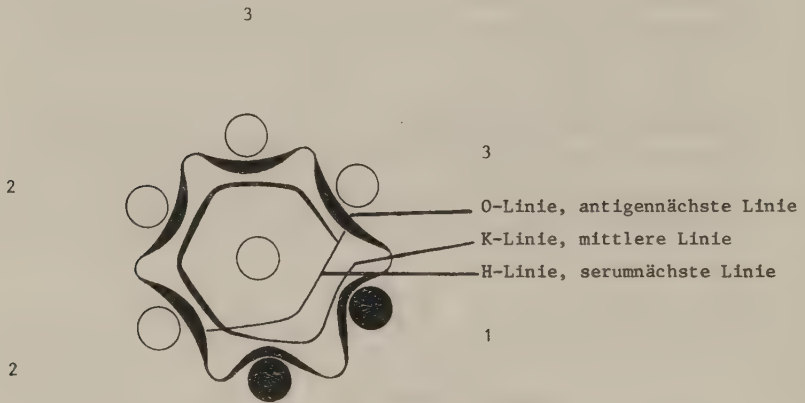


Abb.4: Immunpräzipitationslinien zwischen Anti lebend 10407-Serum (zentral) und lebenden E.coli 10407 Kolonien (1) sowie Überstand aus einer dicken Bakteriensuspension abzentrifugiert, unbehandelt (2) und 20 Minuten auf 60°C erhitzt (3).

5.3 Heterologe Neutralisation von Colitoxinen mit Anti lebend 10407-Serum

In einem Parallelversuch zur heterologen Neutralisation mit Kontrolle des Ergebnisses im Permeabilitätstest an der Kaninchenhaut versuchte ich, Reaktionsprodukte von Anti lebend 10407-Serum und Anti AMS 10407-Serum einerseits und heterologen Antigenen andererseits (AMS und lebende Kolonien von E.coli 149, EB 170 sowie toxische Colistämme, die uns von EVANS zur Verfügung gestellt wurden) darzustellen. Dabei fiel auf, daß die beiden erstgenannten Stämme, sowie E.coli K 9190, E.coli O 95 und E.coli 19584 (5,6) nur unregelmäßig erscheinende wolkige Präzipitationslinien gegen die Immunseren erkennen ließen, die aber infolge ihrer Unschärfe und ihres unregelmäßigen Auftretens nicht als spezifische Linien zu deuten waren. (Diese Immunpräzipitationslinien habe ich nicht photographiert.)

6. Ergebnisse der Diffusion von Immunseren gegen Kolonien lebender Bakterien

6.1 Beschreibung der auftretenden Linien

Im Prinzip traten bei allen Versuchen mit lebenden Bakterien oder deren Bestandteilen drei Linien immer wieder in Erscheinung (s. Abb.4).

Es waren dies:

- a) eine starke, breite, nächst dem Antigen (Kolonie, Bakteriensuspension, AMS) gelegene Linie (O-Linie). Sie entspricht auch der Linie zwischen Anti lebend 10407- und AMS 10407-Serum;
- b) eine dem eingefüllten Antiserum nächst gelegene feinere Linie (H-Linie);
- c) eine ebenfalls feinere mittlere Linie (K-Linie).

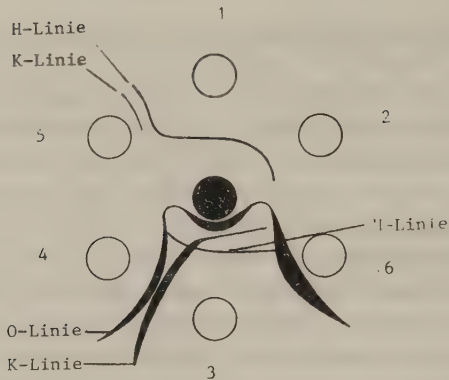


Abb.5: Immunpräzipitation zwischen den Antiseren Anti AMS 10407 (1), Serum F* (2), Anti AMS 10407 abgesättigt ** (4), Anti lebend 10407-Serum (3) und den Antigenen AMS 10407 (5), O 78 Lipopoly=saccharidantigen (6), E.coli 10407 Kolonie (zentral)

* Serum F = Antiserum, gewonnen durch Immunisierung mit formalinabgetöteten E.coli 10407

** = enthält viel überschüssiges gelöstes O und K Antigen

6.2 Identifizierung der entstandenen Immunpräzipitationslinien:

6.2.1 Nachweis der O-Linie

Die durch Körperantigen und entsprechende Antikörper auftretende Linie wurde auf folgende Weise ermittelt:

- a) Lyophilisiertes E.coli O 78 Antigen (Lipopolysaccharid METZ, 1mg/ml) ergab im Plattenimmundiffusionstest neben einer Kolonie E.coli 10407 eingefüllt, gegen Anti lebend 10407-Serum eine dicke, breite Linie, die nahtlos in die kolonienächste Immunpräzipitationslinie überging (Abb.5, O-Linie).

- b) Die Linie, die beim Absättigen von Anti lebend 10407-Serum mit lyophilisiertem O 78 Lipopolysaccharidantigen verschwindet, entspricht genau dieser O-Linie.
- c) Bei abgesättigten Seren (Antigen: E.coli 10407, 20 Minuten auf 60°C erhitzt) traten infolge Antigenüberschuß gegen nicht abgesättigtes Anti lebend 10407-Serum zwei Linien auf, von denen die stärkere mit der kolonienächsten Immunpräzipitationslinie identisch war (Abb.5 und 6, O-Linie und K-Linie).

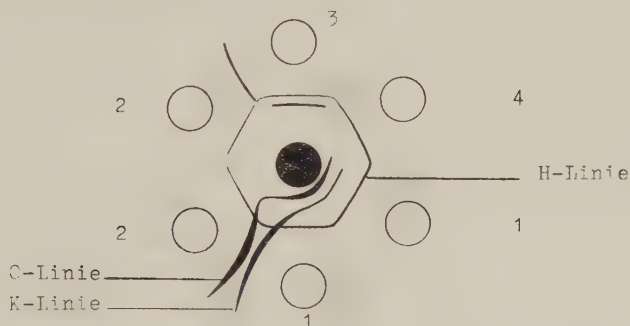


Abb.6: Immunpräzipitationslinien zwischen Anti lebend 10407-Serum (1), Anti AMS 10407-Serum, abgesättigt mit E.coli 10407, 20 Minuten auf 60°C erhitzt(2), Serum F (3), Anti AMS 10407 (4) und einer E.coli 10407 Kolonie (zentral)

6.2.2 Nachweis der H-Linie

Folgende Seren ergaben mit E.coli 10407 Kolonien eine H-Linie:

Anti lebend 10407-Serum,

Anti AMS 10407-Serum,

"Serum F" und

die drei oben angeführten Seren, jeweils abgesättigt mit E.coli 10407 Bakterien, 2 Stunden gekocht oder 20 Minuten auf 60°C erhitzt.

Folgende Tatsachen veranlaßten mich, diese Immunpräzipitationslinie als H-Linie zu bezeichnen:

- a) Serum F erbrachte diese Linie ebenfalls, obwohl es im Permeabilitäts= test an der Kaninchenhaut die Wirkung des Kulturfiltrates 10407 und AMS 10407 nicht neutralisieren konnte (Abb.6). Daraus folgerte ich, daß diese Linie nicht mit der Immunpräzipitationslinie von antitoxi= schen Antikörpern und Colitoxin identisch sein kann.

- b) Das Antigen, das mit entsprechenden Antikörpern die serumnächste Linie ergab, muß relativ hitzelabil sein; es überdauerte eine 20 minütige Erhitzung auf 60°C nicht.
- c) Die Linie, die den unbeweglichen atoxischen Varianten E.coli 10407 I und E.coli 10407 II fehlte, entsprach dieser Linie. Die toxische Variante mit rauher Oberfläche war wie E.coli 10407 beweglich und besaß dieses H-Antigen (Abb.7, Ziffer 3).

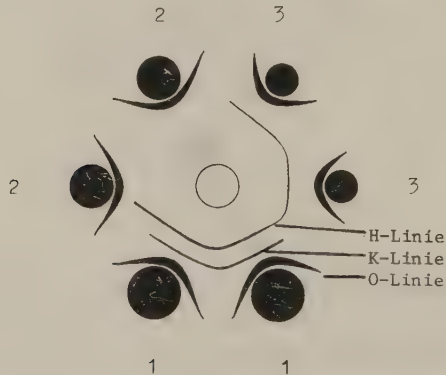


Abb.7: Immunpräzipitationslinien zwischen Anti lebend 10407-Serum (zentral) und Kolonien von E.coli 10407 (1), E.coli 10407 I (2) und E.coli 10407 rauh (3)

6.2.3 Nachweis der K-Linie

Die zum Absättigen von Immuns serum verwendete E.coli 10407 Bakteriensuspension, 20 Minuten auf 60°C erhitzt, ergab, wie beschrieben, gegen Anti lebend 10407-Serum zwei Linien, von denen ich die antigennächste bereits als O-Linie identifiziert habe. Die zweite Linie ging nahtlos in die mittlere Linie zwischen Anti lebend 10407-Serum und E.coli 10407 Kolonien über (Abb.5 und 6). Während der 20 minütigen Behandlung von E.coli 10407 bei 60°C muß Geißelantigen zugrunde gegangen sein, ebenso das instabile Colitoxin. Es blieben also Kapsel- und Körperantigen übrig. Daraus folgt, daß die dritte Linie aus der Präzipitation von Kapselantigen und entsprechenden Antikörpern stammt.

Diese K-Linie war bei den drei von mir gewonnenen Mutanten im Immundiffusionstest gegen Anti lebend 10407-Serum nur schwach ausgebildet und auf den Platten photographisch nicht darzustellen. Nach stärkerer Konzentrierung der Antigene von E.coli 10407 I und II sowie der Antigene des Stammes mit rauher Oberfläche wurde eine K-Linie sichtbar. Abbildungen davon sind in dieser Arbeit nicht aufgeführt.

D. D I S K U S S I O N

OUCHTERLONY (34,35,36) führte 1947 die Immundiffusion in die Bakteriologie und Serologie ein und eröffnete weitreichende Möglichkeiten zum Studium von Antigenen und Antiseren. ELEK (5) modifizierte 1948 das von OUCHTERLONY beschriebene Verfahren für die Identifizierung toxinproduzierender Diphtheriebakterien. Anstatt des antibakteriellen "OUCHTERLONY-Agars" verwendete er Nähragar, in den er einen mit Diphtherieantitoxin getränkten Filterpapierstreifen einlegte.

Als es möglich war, durch hochgereinigtes Choleratoxin auch Choleraantitoxin herzustellen, konnten VASIL, HOLMES und FINKELSTEIN (47) mit der von ELEK beschriebenen Methode Choleratoxin in vitro nachweisen.

Nachdem viele Autoren (6-10,16-19,36) die Ähnlichkeit des Colitoxins mit dem Choleratoxin aufgezeigt hatten, lag es nahe, auch für den Nachweis toxischer Colikeime nach einem in vitro Test in Anlehnung an OUCHTERLONY und ELEK zu suchen. GYLES (unpublished data 18), SMITH und SACK (44) konnten das hitzelabile Colitoxin mit Choleraantitoxin neutralisieren. Umgekehrt gelang es diesen Autoren aber nicht, Choleratoxin mit Antiseren gegen Colitoxin zu neutralisieren.

Viele Autoren versuchten, die Wirkung des von ihnen angenommenen Colitoxins anhand verschiedener Versuchsanordnungen zu beschreiben. Die einen verwendeten den Dünndarm von Versuchstieren in vivo (6,13) oder in vitro (27) zum Nachweis, andere stellten die Toxinwirkung im Test an der Kaninchenhaut (Änderung der Kapillarpermeabilität) oder durch Zugabe von toxinhaltigen Proben zu Zellkulturen dar (7,8). In Anlehnung an den Diphtherietoxin- (5) und Choleratoxinnachweis (47) versuchten BETTELHEIM und TAYLOR (2) und GYLES (17) mit Hilfe der Immunelektrophorese durch direkten Vergleich toxischer und atoxischer Colistämme ein spezifisches Immunpräzipitat zu gewinnen, um eine zutreffende Aussage über das Toxinbildungsvermögen des zu untersuchenden Stammes zu erhalten.

Dies gelang BETTELHEIM und TAYLOR bei nicht humanpathogenen Stämmen, ebenso fand GYLES (18) bei human- und tierpathogenen Colibakterien eine Immunpräzipitationslinie, von der er glaubte, es könnte eine spezifische Präzipitationslinie von Antitoxin und hitzelabilem Colitoxin sein.

In meinen Versuchen sollte zum Nachweis toxischer Colistämme ein leicht durchzuführender in vitro Test gefunden werden. Als toxischen Colistamm verwendete ich hauptsächlich *Escherichia coli* 10407, der in Bangla Desh aus den Stühlen von an choleraähnlichen Durchfällen erkrankten Patienten angezüchtet wurde (6). Bei der Züchtung dieses Stammes in Casamino-Hefenährlösung ließ sich ein Kulturfiltrat gewinnen, das die Colitoxine enthielt, welche von EVANS (6) beschrieben wurden. Danach handelt es sich um eine hitzestabile, dialysierbare, nicht antigen wirksame Komponente niederen Molekulargewichtes und ein hochmolekulares, hitzelabiles Colitoxin, das antigen wirksam ist und sich nicht neutralisieren läßt (6,22, 36a,42). Seine Wirkung geschieht nicht etwa über eine Anregung der Adenylcyclase in der Darmwand (22) wie beim hitzelabilen Colitoxin oder beim Choleratoxin, sondern sehr wahrscheinlich benützt das Toxin einen eigenen biochemischen Mechanismus. Eine rasch einsetzende Beeinträchtigung der glatten Darmmuskulatur ist von vielen nichtbakteriellen Substanzen bekannt, wie u.a. von Kininen, Acetylcholin, Serotonin und Histaminen. Mit diesen Substanzen läßt sich, ebenso wie mit dem am isolierten Kaninchenileum nachgewiesenen Colitoxin, ein rascherer Eintritt der Darmrhythmusstörung beobachten. Im Gegensatz dazu tritt bei Stoffen, die über eine Aktivierung der Adenylcyclase wirken, der biologische Effekt erst nach einer Verzögerung von 20-30 Minuten ein.

EVANS und GORBACH (7) berichteten, daß der Permeabilitätsfaktor von Colitoxin, wie ihn CRAIG (4) für Choleratoxin im Test auf der Kaninchenhaut nachgewiesen hat, mit dem labilen Colitoxin aus dem "ileal loop test" identisch sei. Beide ergaben eine dosisabhängige Reaktion, beide waren empfindlich gegen Hitze und jeweils mit Antiserum neutralisierbar. Besonders bedeutsam erschien EVANS (7), daß Antiserum gegen hochgereinigtes Choleratoxin sowohl den Permeabilitätsfaktor als auch das hitzelabile Colitoxin zu neutralisieren vermochte.

Antitoxische Antiseren konnten in meinen Versuchen homologes Colitoxin immer neutralisieren, wenn das Ergebnis der Neutralisation im Test auf der Kaninchenhaut überprüft wurde, dagegen war die Störung der Darmrhythmik von Kulturfiltrat am isolierten Kaninchendarm weder mit homologen noch mit heterologen Antiseren aufzuheben. Das deutet darauf hin, daß der darmwirksame Colitoxinbestandteil und der die Durchlässigkeit der Hautkapillaren erhöhende Faktor zwei verschiedene Substanzen darstellen. Diese Ergebnisse lassen sich mit den Versuchen von SMITH und GYLES (42) und GYLES (18) vergleichen, denen zwar die Neutralisation des hitzelabilen, nicht jedoch des hitzestabilen Colitoxins gelang.

Seren von Kaninchen, die durch Immunisierung mit lebenden oder formalinabgetöteten *E.coli* 10407 gewonnen wurden, ergaben im Immundiffusionstest gegen lebende *E.coli* 10407 Kolonien gleiche Präzipitationslinien. Beim Versuch jedoch, Kulturfiltrat von *E.coli* 10407 mit letzterem Serum zu neutralisieren, mußte ich feststellen, daß dies auch bei einer Verdünnung von 1:10 nicht möglich war. Das hitzelabile Colitoxin mußte folglich bei der Behandlung der Bakterien mit Formalin geschädigt worden sein. 20 Minuten auf 60°C erhitzte und gekochte *E.coli* 10407 induzierten bei der Immunisierung keine antitoxischen Antikörper.

Ebenso erbrachte die orale Immunisierung mit lebenden und toten Bakterien weder in der Probe nach Widal nachweisbare Antikörper gegen *O* Antigen, noch im Test an der Kaninchenhaut antitoxische Antikörper im Kaninchenserum (Tab.1). Toxin von *E.coli* 10407 störte den rhythmischen Bewegungsablauf der terminalen Ileumstücke von sowohl enteral als auch parenteral immunisierten Tieren. Wie im Test an der Kaninchenhaut, beurteilte ich auch im Test am isolierten Ileum die Ergebnisse mit positiv oder negativ (keine Abstufungen !).

Kulturfiltrat war in meinen Versuchen bis zu einer Verdünnung von 1:4, Ammoniumsulfat gefälltes Präzipitat bis zu einer Verdünnung von 1:16 im Test auf der Kaninchenhaut positiv. Dabei spielte es keine Rolle, ob dem Casamino-Hefe-Nährmedium Spurenelemente zugesetzt waren oder nicht.

ETKIN und GORBACH (9), GYLES et al. (17), SCHIMMELPFENNIG (40), sowie SMITH und SACK (44) gelang bei schweinepathogenen Stämmen eine Kreuzneutralisation zwischen verschiedenen tierpathogenen Colibakterien.

SMITH und SACK konnten dies bei humanpathogenen Stämmen nicht nachweisen.

Bei meinen Versuchen mit Antiserum gegen lebende E.coli 10407 konnte nur der Permeabilitätsfaktor des schweinepathogenen Stammes O 149 neutralisiert werden, nicht dagegen der Hautfaktor des die Oedemkrankheit von Ferkeln verursachenden Stammes EB 170 (40). Die Neutralisationsversuche mit Kulturfiltrat des säuglingspathogenen Stammes O 119 (22729) ließen sich nicht eindeutig beurteilen.

Neben der Überprüfung der Neutralisationsergebnisse im Test an der Kaninchenhaut und an der isolierten Darmschlinge wollte ich die heterologe Neutralisation auch im Plattenimmundiffusionstest sichtbar machen. Es kamen dabei nur wolkige Präzipitationslinien zwischen Anti lebend 10407-Serum und Kolonien von E.coli O 149, E.coli 170, sowie den Kolonien der Stämme 9190, 16095 und 19584 (6) zum Vorschein. Die Identität dieser Linien war nicht aufzuklären. Wahrscheinlich beruhen diese Linien, oder besser wolkigen Strukturen, auf einer bisher unbekannten Antigenverwandtschaft dieser Stämme mit E.coli 10407.

Ich vermutete, eine eventuell auftretende spezifische Linie zwischen antitoxischen Antikörpern und Colitoxinen nachweisen zu können, wenn eine Variante von E.coli 10407 zu erhalten wäre, deren Antigenstruktur, abgesehen vom Toxinbildungsvermögen, vollkommen mit dem Wildtyp übereinstimmen würde. Zur Gewinnung einer solchen Mutante behandelte ich E.coli 10407 mit Nitrosoguanidin, das bei Bakterien in der Wachstumsphase eine erhöhte Mutationsrate verursacht. Es zeigte sich, daß Kolonien, die ein- bis zweimal im Test an der Kaninchenhaut negativ reagierten, diese Eigenschaften nach weiteren Subkultivationen wieder verloren. Ob dieser Prozeß eventuell eine spontane Rückmutation (aufgrund intrazellulärer Reparationsvorgänge) darstellt, bleibt ungeklärt. Deshalb habe ich toxinnegative Varianten wiederholt mit Nitrosoguanidin behandelt und so zwei stabil toxinnegative Varianten E.coli 10407 I und E.coli 10407 II erhalten. Sie erbrachten im Immundiffusionstest gegen Anti lebend 10407-Serum keine Immunpräzipitationslinie von Geißelantigen und Antikörper gegen Geißelantigen (H-Linie). Die Immunpräzipitationslinie von Kapselantigen und Antikörper gegen Kapselantigen (K-Linie) war bei beiden Varianten und einer weiteren, von mir gewonnenen Variante, E.coli 10407 rauher Stamm (Stamm mit rauher Oberfläche) kaum darstellbar (siehe S.29). E.coli 10407 I und II erwiesen sich im Beweglichkeitsagar als unbeweglich (Abb.2).

Kulturfiltrat dieser beiden Varianten I und II von E.coli 10407 ergab aber noch regelmäßig ein positives Ergebnis im Test an der isolierten Ileumschlinge. Das spricht möglicherweise gegen die Annahme, daß hitzestabiles und hitzelabiles Colitoxin Spaltprodukte eines größeren Moleküls seien (26). Außerdem ist es schwierig, dies mit der Plasmidtheorie von GYLES, SO und FALKOW (20) in Einklang zu bringen, die annahmten, daß die Produktion von hitzelabilem und hitzestabilem Colitoxin an ein einziges Plasmid im Bakterienkörper geknüpft sei und somit das gesonderte Vorkommen dieser beiden Toxinkomponenten praktisch nicht möglich wäre. Gut übereinstimmen würde mein Ergebnis mit dem von SMITH und GYLES (42), die überzeugt sind, daß hitzestabiles und hitzelabiles Colitoxin zwei Formen eines Toxins seien. Nur die hitzestabile Form könne alleine vorkommen, hitzelabiles Colitoxin trete dagegen nur in Verbindung mit hitzestabilem Toxin auf (42). Die Intensität und Schärfe der auftretenden Immunpräzipitationslinien war umso stärker, je höher sowohl die Antigen-, als auch die Antikörperlösungen konzentriert waren.

Bei der Immunisierung mit lebenden Bakterien fand ich umso höhere antitoxische Titer, je höher der agglutinierende Antikörpertiter war, mit Ausnahme des Stammes E.coli O 149, der bei niedrigem Antikörpertiter gegen O-Antigen einen relativ hohen antitoxischen Antikörpertiter aufwies (Tab.1).

Die Zubereitung hoher Antigenkonzentrationen durch Ausfällen des Colitoxins mit Ammoniumsulfat oder mit Hilfe der Ultrafiltration bereitete keine Schwierigkeiten. Die Konzentrierung des Antiserums über das 15 fache des Ausgangsserums hinaus war praktisch nicht möglich. Einerseits lösten sich mit Ammoniumsulfat ausgesalzte, relativ große Serumeiweißmengen in wenig gepufferter Kochsalzlösung nur schwer auf, andererseits zogen die Serumeiweißkonzentrate beim Dialysieren gegen gepufferte Kochsalzlösung wieder vermehrt Flüssigkeit an. Diese hochkonzentrierten Seren ließen sich trotz vorherigen Abzentrifugierens nicht durch Membranfilter pressen. Gerade aber die Sterilität der verwendeten Substanzen war Voraussetzung für das Gelingen meiner Versuche mit dem Plattenimmundiffusionstest, da der Nähragar nach dem Besticheln der Agaroberfläche mit den zu untersuchenden Bakterienstämmen 18 Stunden bei 37°C bebrütet werden mußte.

Für die Gewinnung abgesättigter Immunsereen habe ich meist Seren verwendet, die nach i.v. Injektionen mit lebenden Bakterien gewonnen wurden, da

diese gegen E.coli 10407 Kolonien im Plattenimmundiffusionstest die meisten und deutlichsten Immunpräzipitationslinien erbrachten.

Als Antigenzubereitungen dienten mir dicke Bakteriensuspensionen. Sie boten den Vorteil, daß die damit abgesättigten Seren kaum verdünnt wurden und somit die Immunpräzipitationslinien an Deutlichkeit nur gering einbüßten.

Das Absättigungsergebnis kontrollierte ich mit der Probe nach Widal, dem Permeabilitätstest an der Kaninchenhaut und dem Plattenimmundiffusionstest. Stufenweises Absättigen mit bekannten Antigenen konnte alle drei von mir erkannten Immunpräzipitationslinien nach Wunsch zum Verschwinden bringen.

Mit Hilfe des Plattenimmundiffusionstests war es möglich, die Vorteile der Mikro-Ouchterlony Technik mit der Methode des Elek-Tests auf einer Platte zu verbinden und damit anhand von bekannten Antigenlösungen, lebenden Kolonien und Immunseren, die auftretenden Immunpräzipitationslinien zu identifizieren.

E.coli 10407 Kolonien ergaben gegen Seren, gewonnen durch i.v.Injektion von lebenden und formalinbehandelten E.coli 10407 jeweils drei Linien, von denen eine als Präzipitationslinie zwischen Körperantigen und Antikörper gegen Körperantigen (O-Linie), die andere als Präzipitationslinie zwischen Kapselantigen und Antikörper gegen Kapselantigen (K-Linie) und die dritte als Präzipitationslinie zwischen Geißelantigen und Antikörper gegen Geißelantigen (H-Linie) erkannt wurde.

Antiseren gegen Ammoniumsulfat gefälltes Präzipitat bildeten gegen E.coli 10407 deutlich nur die sog. H-Linie, angedeutet auch die O- und K-Linie. Aus antitoxischen Antiseren gelang es durch Absättigen mit E.coli 10407, die vorher 20 Minuten auf 60°C erhitzt wurden, alle Körper- und Kapselantigene zu entfernen. Der Immundiffusionstest und der Test an der Kaninchenhaut ließen erkennen, daß neben den antitoxischen Antikörpern und Antikörpern gegen Geißelantigen nur noch ein Überschuß an Körper- und Kapselantigen im abgesättigten Immunserum vorhanden war.

Nur im Test an der Kaninchenhaut war es möglich, die Neutralisation des Colitoxins mit antitoxischen Immunseren zu demonstrieren. Der Immundiffusionstest allein ergab als Reaktionsprodukt von antitoxischen Antikörpern und homologem Colitoxin - zumindest bei E.coli 10407 - keine sichtbaren Immunpräzipitationslinien. Damit stimmen meine Ergebnisse mit denen von GYLES (17) überein, der ebenfalls zwischen E.coli 10407 Toxinen und homo-

logen Antiseren keine spezifischen Immunpräzipitationslinien erhielt. Mit heterologen antitoxischen Antiseren glaubte er, eine solche spezifische Immunpräzipitationslinie erreicht zu haben.

Mit Hilfe von Nähragarplatten und eingelegten serumgetränkten Filterpapierstreifen wollte FLEISCHHAUER (10,11) Aussagen über das Toxinbildungsvermögen von darauf ausgestrichenen Colibakterien machen. In seiner ersten Mitteilung (10) zog er aufgrund der Stärke und des zeitlichen Auftretens von Immunpräzipitationslinien Rückschlüsse auf die Toxizität. Er bezweifelte darin überhaupt die Existenz eines Colienterotoxins, da abgetötete Colibakterien ebenfalls Immunpräzipitationslinien erzeugten. Lebende Bakterien produzieren seiner Meinung nach stärkere Linien als abgetötete Bakterien.

Die Intensität und das zeitliche Auftreten von Immunpräzipitaten war für mich bei der Identifizierung toxischer Colistämme nicht ausschlaggebend, da die Stärke der Linien von den Konzentrationen der Antigene und Antikörper abhängig war. Außerdem kamen zu den Linien, die 18 Stunden nach dem Einfüllen der Platten mit Immunsere in Erscheinung traten, innerhalb weiterer 48 Stunden keine neuen Linien mehr hinzu.

BETTELHEIM und TAYLOR (17) versuchten unter Zuhilfenahme der Immunelektrophorese eine spezifische Präzipitationslinie zwischen Colitoxin und antitoxischen Antikörpern zur Identifizierung von toxischen Colibakterien zu finden. GYLES (17) beschrieb eine sogenannte Linie "a", die in fast allen Fällen nur als Immunpräzipitationslinie zwischen toxischen Colibakterien und antitoxischen Antikörpern in Erscheinung trat. Ebenso berichteten BETTELHEIM und TAYLOR von ihrer sogenannten Linie "1", die auch fast ausschließlich nur bei toxischen Vertretern der Colibakterien aufgetreten war. Übereinstimmend mit GYLES konnte ich feststellen, daß Toxin von E.coli 10407 gegen homologes antitoxisches Antiserum keine sichtbare Immunpräzipitationslinie (Linie zwischen Colitoxin und antitoxischen Antikörpern - Toxinlinie) erzeugt. Allerdings beschrieb GYLES (17) seine spezifische Immunpräzipitationslinie "a" auch zwischen Toxin von E.coli 10407 und heterologen antitoxischen Antiseren. Das Fehlen einer solchen Immunpräzipitationslinie mag darauf beruhen, daß, wie GYLES vermutete, E.coli 10407 grundsätzlich gegen homologes antitoxisches Antiserum keine sichtbare "Toxinlinie" erbringt. Eine weitere

re Möglichkeit für das Fehlen einer Immunpräzipitationslinie kann darin bestehen, daß die Konzentration an antitoxischen Antikörpern in meinen Immunseren (maximaler Neutralisationstiter im Test auf der Kaninchenhaut 1:160) für eine sichtbare Immunpräzipitation einfach nicht ausreichte. Allerdings habe ich in meinen weiteren Versuchen auch keine spezifische "Toxinlinie" zwischen Toxinen von E.coli 10407 und heterologen antitoxischen Seren erhalten; zumindest konnten die auftretenden Linien nicht als spezifische Linien gedeutet werden.

Vielleicht gelingt ein in vitro Nachweis von Colitoxin nach dem Muster des Elek-Testes für Diphtheriebakterien oder des Tests von VASIL und Mitarbeitern (47) für den in vitro Nachweis von Choleratoxin, wenn es einmal möglich sein wird, Colitoxin entsprechend dem Choleratoxin hochgereinigt darzustellen und dieses zur Immunisierung von Versuchstieren zu verwenden. Dies dürfte aber wiederum auf große Schwierigkeiten stoßen, da das Colitoxin nach SÖDERLIND (45) nicht einheitlich sein soll, außerdem das hitzestabile Toxin (6,7,16) keine antigenen Eigenschaften besitzt und somit nicht befähigt ist, im lebenden Organismus die Antikörperbildung zu induzieren.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein leicht durchzuführender in vitro Test gefunden werden, mit dessen Hilfe das Toxinbildungsvermögen von Colibakterien untersucht werden kann. In meinen Versuchen verband und variierte ich die Nachweismethoden von OUCHTERLONY und ELEK und kontrollierte die Ergebnisse der Immundiffusions- und Absättigungsversuche im Test an der Kaninchenhaut und dem Colitoxinnachweis am isolierten Kaninchenileum.

Zwischen dem von mir hauptsächlich verwendeten Stamm E.coli 10407 und homologen Antiseren erhielt ich im wesentlichen drei Immunpräzipitationslinien, die ich beim Vergleich mit unterschiedlich behandelten E.coli 10407 Bakterien und deren Produkten als Immunpräzipitationslinien von Körper-, Kapsel- und Geißelantigen mit entsprechenden Antikörpern identifizieren konnte. Eine spezifische Linie zwischen antitoxischen Antiseren und homologen Kolonien oder Antigenezubereitungen von E.coli 10407 erhielt ich in meinen Versuchen nicht, da auch Antiserum gegen formalinabgetötete Bakterien (Serum F) mit E.coli 10407 Kolonien die gleichen drei Linien ergab wie Serum, gewonnen durch Immunisierung mit lebenden Bakterien, obwohl Serum F homologes Kulturfiltrat nicht neutralisieren konnte.

Die mit Hilfe von N-Methyl-Nitroso-N-Nitroguanidin gewonnenen Varianten E.coli 10407 I und II, welche im Test an der Kaninchenhaut negative Ergebnisse zeigten, ihre darmrhythmusstörende Wirkung aber behielten, erbrachten im Immundiffusionstest außer dem Fehlen der Immunpräzipitationslinie zwischen Geißelantigen und Antikörpern gegen Geißelantigen keine weiteren Anhaltspunkte für das Auftreten einer spezifischen Linie von Colitoxin und antitoxischen Antikörpern.

Zwischen Antiseren gegen E.coli 10407 und heterologen Bakterienstämmen erhielt ich ebenfalls Immunpräzipitate, die aber nur wolkige Strukturen aufwiesen und die ich mangels Vergleichsmöglichkeiten nicht als spezifische Linien bezeichnen konnte.

Heterologe Neutralisation von Colitoxinen mit antitoxischen Immuseren stellte ich nur bei einigen von mir verwendeten Colistämmen fest. Alle in dieser Arbeit benützten antitoxischen Antiseren waren nicht in der Lage, die darmirritierende Wirkung des Kulturfiltrats zu neutralisieren. Die Wirkung der verschiedenen Colitoxine auf die Durchlässigkeit der Hautkapillaren konnte ich mit homologen Antiseren immer, mit heterologen Antiseren nur in einigen Fällen aufheben. Die isolierten Ileumstücke von enteral und parenteral immunisierten Kaninchen waren gegen die darmirritierende Wirkung der Colitoxine nicht geschützt.

F. L I T E R A T U R

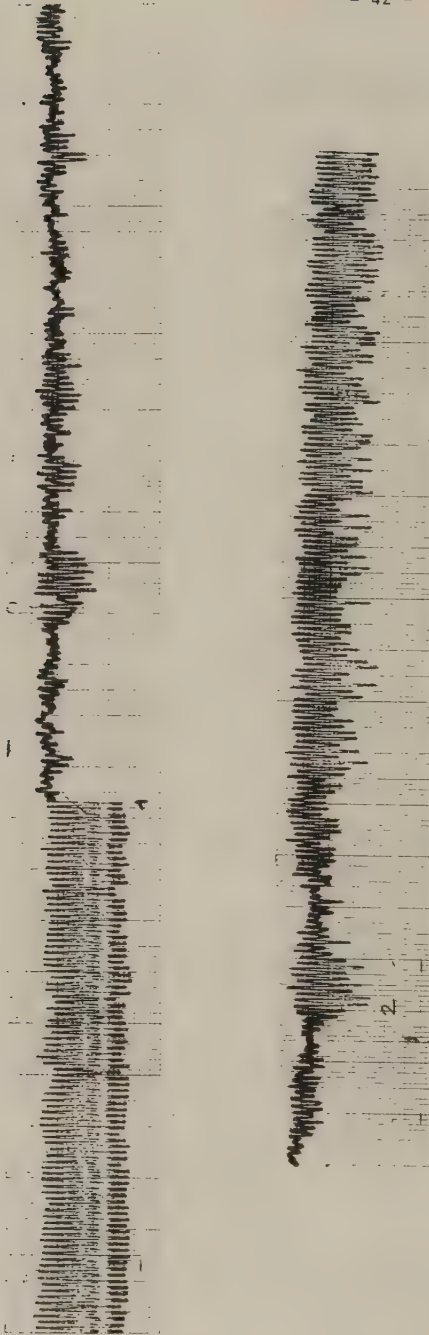
- 1 ADELBERG, E.A., M.MANDEL and G.C.CHEN:
Optimal Conditions for Mutagenesis by
N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitosoguanidine in *Escherichia coli* K 12
Biochem.Biophys.Res.Comm. 18 (1965) 788-795
- 2 BETTELHEIM, K.A. and J.TAYLOR:
Soluble antigens of enteropathogenic *Escherichia coli*
J.Med.Microbiol. 3 (1970) 655
- 3 BOCKEMÜHL, J.:
Toxinbedingte Gastroenteritis durch Vibrionen und Colibakterien (Zur
Pathogenese der toxinbedingten Gastroenteritis durch Vibrionen und
Colibakterien)
Dtsch.Med.Wschr. 100 (1975) 487
- 4 CRAIG, J.P.:
Preparation of the permeability factors of *Vibrio cholerae*
J.of Bact. 92 (1966) 793
- 5 ELEK, S.:
The recognition of toxinogenic bacterial strains in vitro
Brit.Med.J. 1 (1948) 493
- 6 EVANS, D.G., D.J.EVANS, JR. and N.F.PIERCE:
Differences in the response of rabbit small intestine to heat-labile
and heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*
Infect.Immunity 7 (1973) 873
- 7 EVANS, D.J., JR., D.G.EVANS and S.L.GORBACH:
Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic
Escherichia coli isolated from man
Infect.Immunity 8 (1973) 725
- 8 EVANS, D.G., D.J.EVANS JR. and S.L.GORBACH:
Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* and serum anti-
toxin activity by the vascular permeability factor assay
Infect.Immunity 8 (1973) 731
- 9 ETKIN, S. and S.L.GORBACH:
Studies on enterotoxin from *Escherichia coli* associated with
acute diarrhoea in man
J.lab.clin.med. 73 (1971) 81
- 10 FLEISCHHAUER, G.:
Über einen Toxinnachweis bei Colibakterien mit Hilfe einer Präzipitation
im Plattentest
Zbl.Bakt.I Orig. 173 (1958) 551

- 11 FLEISCHHAUER, G.:
Über einen Toxinnachweis bei Colibakterien mit Hilfe einer Präzipitin=
reaktion II. Mitteilung
Zbl.Bakt.Orig. 175 (1959) 388
- 12 GORBACH, S.L., M.D.:
Acute diarrhoea - a "toxin" disease?
N.Eng.J.Med. 287 (1972) 791
- 13 GORBACH, S.L. and C.M.KHURANA:
Toxogenic *Escherichia coli*. A cause of infant diarrhoea in Chicago
N.Eng.J.Med. 287 (1972) 791
- 14 GRADY, G.F., M.D. and G.T.KEUSCH, M.D.:
Pathogenesis of bacterial diarrhoeas (First of two parts)
N.Eng.J.Med. 285 (1971) 831
- 15 GRADY, G.F., M.D. and G.T.KEUSCH, M.D.:
Pathogenesis of bacterial diarrhoeas (Second of two parts)
N.Eng.J.Med. 285 (1971) 891
- 16 GYLES, C.L., D.V.M., PH.:
Discussion: Heat-labile and heat-stabile forms of the Enterotoxin from
Escherichia coli strains enteropathogenic for pigs
Ann.N.Y.Acad.Sci. 176 (1971) 314
- 17 GYLES, C.L.:
Immunological study of the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*
and *Vibrio cholerae*
Infect.Immunity 9 (1974) 564
- 18 GYLES, C.L.:
Relationship among heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli* and
Vibrio cholerae
J.Infect.D. 129 (1974) 277
- 19 GYLES, C.L. and D.A.BARNUM:
A heat-labile enterotoxin from strains of *Escherichia coli* enteropatho=
genic for pigs
J.Infect.D. 120 (1969) 419
- 20 GYLES, C.L., M.SO and S.FALKOW:
The enterotoxin plasmids of *Escherichia coli*
J.Infect.D. 130 (1974) 40
- 21 HOLMGREN, J., O.SÖDERLIND and T.WADSTRÖM:
Cross reactivity between heat-labile enterotoxins of *Vibrio cholerae*
and *Escherichia coli* in neutralisation tests in rabbit ileum and skin
Acta path.microbiol.scand.section B 81 (1973) 757

- 22 KANTOR, H.S., P.TAO and S.L.GORBACH:
Stimulation of intestinal adenyl cyclase by *Escherichia coli* enterotoxin: Comparison of strains from infants and adults with diarrhoea
J.Infect.D. 129 (1974) 1
- 23 KAUFFMANN, F.:
"Über die Coli-Enteritis der Säuglinge"
Wien.med.Wschr. 101 (1951) 286
- 24 KELLAWAY, C.H. and W.TURNER:
The liberation of histamine and of adenyl compounds by the toxin of *Cl.Welchii* type D
Aust.J.exp.Biol.med.Sci. 18 (1940) 253
- 25 KELLAWAY, C.H., G.REID and E.R.TRETHEWIE:
Circulatory and other effects of the toxin of *Cl.septique*
Aust.J.exp.Biol.med.Sci. 19 (1941) 63
- 26 LARIVIERE, S., C.L.GYLES and D.A.BARNUM:
Preliminary characterization of the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* F 11 (P 155)
J.Infect.D. 128 (1973) 312
- 27 METZ, H.:
Über die colibedingte Säuglingsenteritis
V.Mitteilung: Untersuchungen am isolierten Kaninchendarm mit Voll- und Teilantigenen von normalen und enteropathogenen Colikeimen
Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig.A 222 (1972) 290
- 28 METZ, H., D.BONU und H.OHGKE:
Die Wirkung menschen- und tierpathogener Colistämme auf den isolierten Kaninchendarm
Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig.A 226 (1974) 215
- 29 METZ, H., H.OHGKE und I.GRASSER:
Zur Toxinproduktion enteropathogener Colibakterien bei Erwachsenen
Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig.A 232 (1975) 252
- 30 MITCHELL, I.deG., M.J.TAME and R.KENWORTHY:
Conditions for the production of *Escherichia coli* enterotoxin in a defined medium
J.Med.Microbiol. 7 (1974) 395
- 31 MOON, H.W. and S.C.WHIPPS:
Systems for testing the enteropathogenicity of *Escherichia coli*
Ann.N.Y.Acad.Sci. 176 (1971) 197
- 32 MOSLEY, W.H., K.M.S.AZIS and A.AHMED:
Serological evidence for the identity of the vascular permeability factor and ileal loop toxin of *Vibrio cholerae*
J.Infect.D. 121 (1974) 1010

- 33 NALIN,D.R.,A.MAHMUD,G.CURLIN,A.AHMED and J.PETERSON:
Cholera toxoid boosts serum Escherichia coli antitoxin in humans
Infect.Immunity 10 (1974) 747
- 34 OUCHTERLONY,Ö.:
Diffusion-in-gel methods for immunological analysis
In progress in allergic V (1958) pp 1-78
- 35 OUCHTERLONY,Ö.:
Diffusion-in-gel methods for immunological analysis
In progress in allergic VI (1962) pp 30-154
- 36 OUCHTERLONY,Ö.:
Quantitative immunoelectrophoresis
Acta path.microbiol.scand.suppl. 154 (1962) 252
- 36a REICHEL,W.:
Zur Wirkung und Auftrennung toxischer Komponenten aus enteropathogenen
Colibakterien
Med.Diss. Universität München 1976
- 37 ROCHA E SILVA,M. and J.GO:
Chemical mediators of the acute inflammatory reactions
Oxford/New York (1972) p.56-99
- 38 SACK,R.B.:
Immunisation with Escherichia coli enterotoxin protects against homo-
logous enterotoxin challenge
Infect.Immunity 8 (1973) 641
- 39 SACK,R.B.,S.L.GORBACH, J.G.BANWELL,B.JACOBS,B.D.CHATERJEE and R.C.MITRA:
Enterotoxigenic Escherichia coli isolated from patients with severe Cho-
lera-like disease
J.Infect.D. 123 (1971) 378
- 40 SCHIMMELPFENNIG,H.H.:
Untersuchungen zur Ätiologie der Oedemkrankheit des Schweines
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg (1970) 1-80
- 41 SMITH,H.W.:
The production of diarrhoea in baby rabbits by the oral administration
of cell-free preparations of enteropathogenic Escherichia coli and
Vibrio cholerae: The effect of antisera
J.Med.Microbiol. 5 (1972) 299
- 42 SMITH,H.W. and C.L.GYLES:
The relationship between two apparently different enterotoxins produ-
ced by enteropathogenic strains of Escherichia coli of porcine origin
J.Med.Microbiol. 3 (1970) 387
- 43 SMITH,H.W. and S.HALLS:
The transmissible nature of the genetic factor in Escherichia coli that
controls enterotoxin production
J.Gen.Microbiol. 52 (1968) 319
- 44 SMITH,N.W. and R.B.SACK:
Immunologic cross-reactions of enterotoxins from Escherichia coli and
Vibrio cholerae
J.Infect.D. 127 (1973) 164

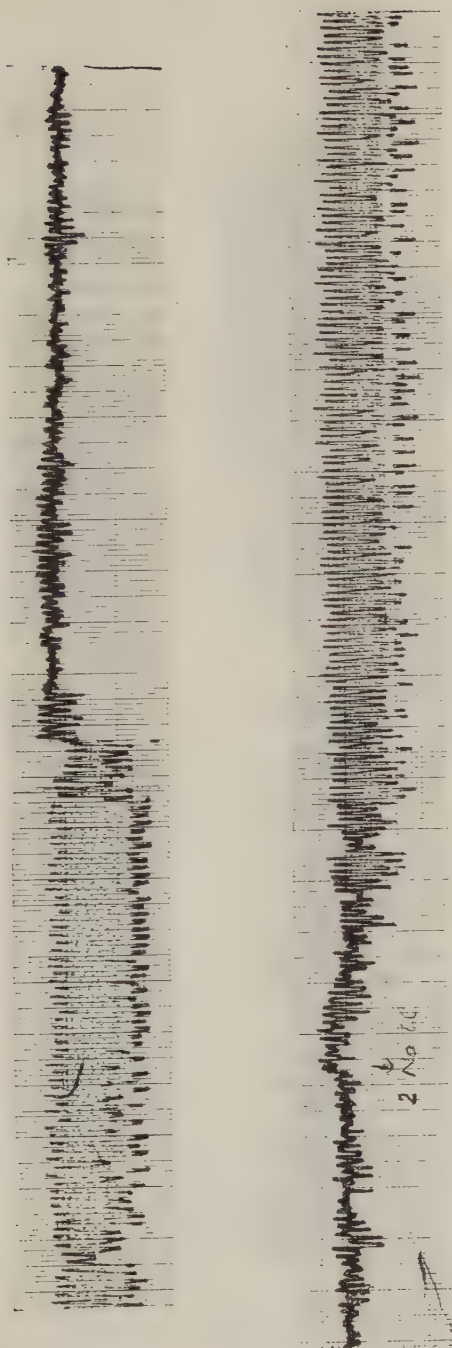
- 45 SÖDERLIND,O.,R.MÖLLBY and T.WADSTRÖM:
Purification and some properties of a heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*
Zbl.Bakt.Hyg., I.Abt.Orig. A 229 (1974) 190
- 46 TRUSZCZYNSKI,M. and J.PILASZEK:
Effects of injections of enterotoxin, endotoxin or live cultures of *Escherichia coli* into the small intestine of pigs
Res.vet.Sci. 10 (1969) 469
- 47 VASIL,M.L.,R.K.HOLMES and R.A.FINKELSTEIN:
Studies on toxogenesis in *Vibrio cholerae* II.An in vitro test of enterotoxin production
Infect.Immunity 9 (1974) 195
- 48 WEIR,D.M.:
Handbook of experimental Immunology
Blackwell Scientific Publications Oxford (1973) 19.1



Kurve 1: Wirkung des Kulturfiltrates von E.coli 10407 I auf den Darm eines Kaninchens

1 = Injektion des Kulturfiltrates von E.coli 10407 I

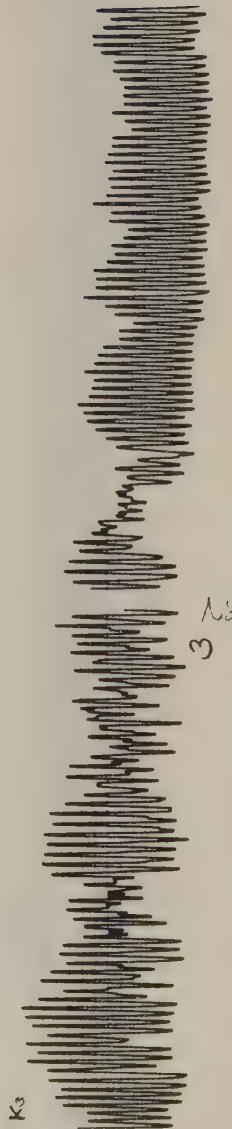
2 = Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung



Kurve 2: Wirkung des Kulturfiltrates von E.coli 10407 II auf den Darm eines Kaninchens

1 = Injektion des Kulturfiltrates von E.coli 10407 II

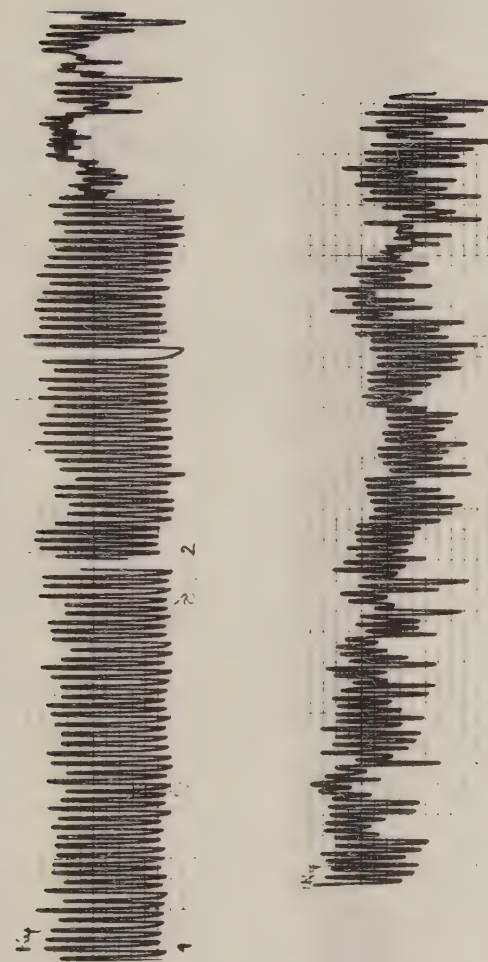
2 = Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung



Kurve 3: Wirkung des Kulturfiltrates von E.coli 10407 auf den Darm eines Kaninchens, das mit lebenden E.coli 10407 i.v. immunisiert wurde

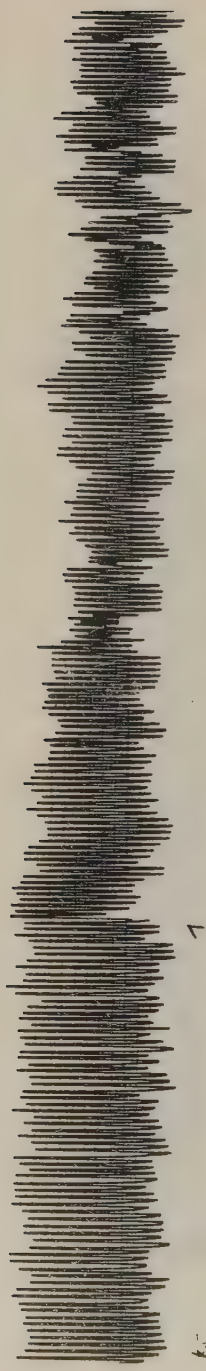
1 = Injektion von physiologischer Kochsalzlösung 2 = Injektion von Kulturfiltrat

3 = Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung



Kurve 4: Wirkung des Kulturfiltrates von E.coli 10407 auf den Darm eines Kaninchen, das mit Ammoniumsulfat gefälltem Präzipitat (AMS) immunisiert wurde

1 = Injektion von physiologischer Kochsalzlösung 2 = Injektion von Kulturfiltrat



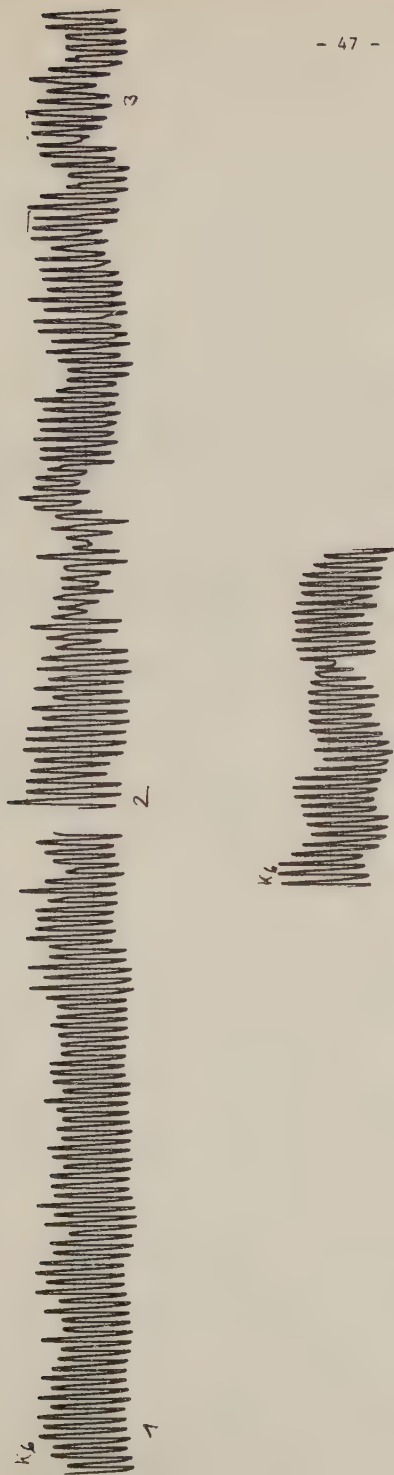
1



2

NaCl

Kurve 5: Wirkung des Kulturfiltrates von E.coli 10407 auf den Darm eines Kaninchens, das mit lebenden E.coli 10407 oral immunisiert wurde
 1 = Injektion von Kulturfiltrat 2 = Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung



Kurve 6: Wirkung des Kulturfiltrates von E.coli 10407 auf den Darm eines Kaninchens, das mit E.coli 10407 - 2 Stunden gekocht immunisiert wurde

1 = Injektion von physiologischer Kochsalzlösung

2 = Injektion von Kulturfiltrat

3 = Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung

Herrn Professor Dr.H.Metz danke ich hiermit für die freundliche Überlassung des Themas und die stets gewährte Förderung, die die Erstellung der Dissertation ermöglicht hat.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Max v.Pettenkofer-Institutes für ihre freundliche Hilfe, vor allem Herrn Dr. Ohgke für seine jederzeit gern erteilte Unterstützung.

Lebenslauf

Am 15.02.1947 wurde ich, Josef Kobler, als Sohn des Schneidermeisters Georg Kobler und seiner Ehefrau Barbara, geb. Schmidlehner, in Oberkastl, Kreis Altötting geboren.

Im Herbst 1953 trat ich in die Volksschule Neumarkt St. Veit ein, wechselte nach vier Jahren an das Ruperti-Gymnasium in Mühldorf/Inn über, wo ich im Sommer 1967 die Reifeprüfung bestand.

Im darauffolgenden Wintersemester 1967/68 begann ich das Studium der Tiermedizin an der Ludwig Maximilians-Universität in München; meine Bestallung als Tierarzt erhielt ich im November 1972. Im Wintersemester 1972/73 legte ich an der Medizinischen Fakultät in München die Ärztliche Vorprüfung, am 15. September 1976 die Ärztliche Prüfung ab.

Dissertationsdruck
GmbH & Co. KG.

M. SCHADEL

86 Bamberg · Hohe-Kreuz-Str. 9b · Tel. 0951/ 21617[5 4414]